

Rafał Jakub Bułdak¹, Renata Polaniak², Michał Kukla¹, Krystyna Żwirska-Korczala¹

¹Katedra i Zakład Fizjologii w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Katedra i Zakład Biochemii Ogólnej w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Wisfatyna — enzym, cytokina czy adipokina? Funkcje biologiczne wisfatyny *in vitro*

Visfatin — an enzyme, a cytokine or an adipokine? Biological functions of visfatin *in vitro*

STRESZCZENIE

Wisfatyna (czynnik stymulujący kolonię pre-B-1 [PBEF-1]/fosforybozylotransferaza nikotynamidu [Nampt]) jest enzymem szlaku rezerwowego biosyntezy NAD⁺ z nikotynamidu. Zwiększoną ekspresję wisfatyny potwierdzono w tkance tłuszczowej, leukocytach oraz w komórkach nowotworowych raka odbytnicy i raka gruczołu krokowego u ludzi i zwierząt. Enzym Nampt u ssaków występuje w dwóch różnych izoformach — wewnątrzkomórkowej (iNampt) i zewnątrzkomórkowej (eNampt). Z jednej strony, wewnątrzkomórkowa izoforma enzymu Nampt jest niezbędnym enzymem szlaku syntezy NAD⁺, a z drugiej — zewnątrzkomórkową izoformę tego białka opisano jako białko, które oddziałuje jako hormon insulino-mimetyczny, nazywany wisfatyną, albo jako zewnątrzkomórkowy enzym szlaku biosyntezy NAD⁺, określane jako eNampt, lub oddziałuje jako cytokina i jest określane jako PBEF-1. Rekombinowana wisfatyna wykazuje właściwości immunomodulacyjne i może aktywować ludzkie leukocyty, indukując wytwarzanie cytokin prozapalnych (IL-1 β , TNF- α i IL-6). Wisfatyna indukuje także tworzenie reaktywnych form tlenu (ROS) w ludzkich komórkach śródbłonkowych izolowanych z żyły pępowinowej i w zróżnicowanych mysich miotubach *in vitro*. W niniejszym artykule przeglądowym pod-

sumowano historię badań i wykazano funkcje tego unikalnego białka w różnorodnym biologicznym kontekście badań *in vitro*.

Słowa kluczowe: wisfatyna, fosforybozylotransferaza nikotynamidu (Nampt), czynnik stymulujący kolonię pre-B-1 (PBEF-1), adipokiny

Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii 2011, tom 7, nr 1, 16-24

ABSTRACT

Visfatin (pre-B colony enhancing factor-1 [PBEF-1]/nicotinamide phosphoribosyltransferase [Nampt]) is the rate-limiting enzyme in the salvage pathway of NAD⁺ biosynthesis from nicotinamide. Overexpression of visfatin has been confirmed in adipose tissue, white blood cells and in colorectal and prostate cancer cells. Two isoforms of Nampt, intra- and extracellular, have been identified in mammals. On the one hand, the intracellular isoform (iNampt) is an essential enzyme of the NAD⁺ biosynthetic pathway, and on the other hand, the extracellular isoform (eNampt) has been reported to act as an insulin-mimetic hormone called visfatin or an extracellular NAD⁺ biosynthetic enzyme named eNampt or a cytokine named PBEF-1. Recombinant visfatin has immunomodulating properties and can activate human leukocytes *in vitro* to induce cytokine production (IL-1 β , TNF- α , IL-6). Visfatin/eNampt also induces the formation of reactive oxygen species (ROS) in human umbilical endothelial cells and differentiated mouse myotubes *in vitro*. This review paper summarises the history of research into visfatin and demonstrates the functions of this unique protein in diverse biological *in vitro* contexts.

Key words: visfatin, nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt), pre-B colony enhancing factor-1 (PBEF-1), adipokines

Endocrinology, Obesity and Metabolic Disorders 2011, vol. 7, No 1, 16-24

Adres do korespondencji: dr n. med. Rafał J. Bułdak
Katedra i Zakład Fizjologii SUM
ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze
tel.: 32 272 23 62
faks: 32 272 23 62
e-mail: rbuldak@sum.edu.pl
Copyright © 2011 Via Medica
Nadesłano: 18.02.2011 Przyjęto do druku: 12.04.2011

Wstęp

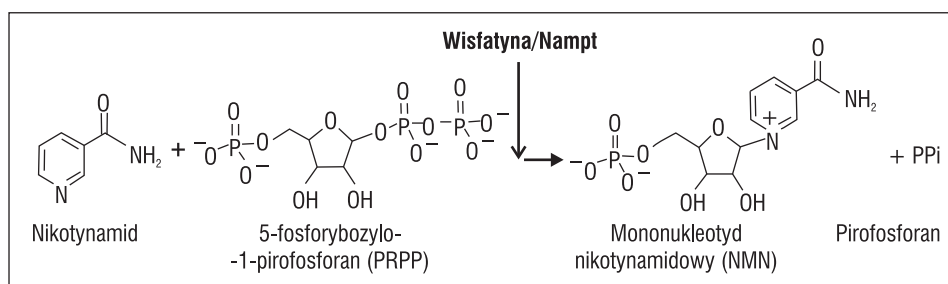
Wisfatyna została po raz pierwszy zidentyfikowana jako cytokina przez Samalą i wsp. [1] w 1994 roku. Cytokina ta jest wydzielana przez aktywowane limfocyty szpikowe, stymulując dojrzewanie limfocytów pre-B wspólnie z interleukiną 7 (IL-7, *interleukin 7*) oraz czynnikiem wzrostowym komórek pnia (SCF, *stem cell factor*) [1]. Poznana struktura krystaliczna wisfatyny okazała się homologiczna z poznanym w latach 60. XX wieku enzymem — fosforybozylotransferazą nikotynamidu (Nampt, *nicotinamide phosphoribosyltransferase*), katalizującym przekształcenie nikotynamidu w mononukleotyd nikotynamidowy (NMN, *nicotinamide mononucleotide*), będący prekursorem w syntezie NAD⁺ w komórkach [2]. W wielu późniejszych pracach wskazano, że źródłem wisfatyny w ustroju może być niemal każda tkanka, a jej poziom ekspresji jest tkankowo specyficzny. W 2005 roku Fukuhara i wsp. [3] wyizolowali z tkanki tłuszczowej białko wykazujące *in vitro* funkcję insulino-mimetyczną względem adipocytów, miocytów oraz hepatocytów hodowanych *in vitro*. W każdym przypadku izolowane białko okazało się tym samym, które izolowali pierwotnie Samal i wsp. przy poszukiwaniu czynnika (cytokiny) stymulującego różnicowanie limfocytów pre-B. Obecnie nazwy dla tego białka używa się naprzemiennie w postaci „wisfatyna/Nampt”. Donorem tego białka w ustroju jest nie tylko tkanka tłuszczowa, a sama nazwa jednoznacznie wskazuje na źródło — trzewną tkankę tłuszczową (VAT, *visceral fat tissue*). Wydaje się, że wisfatyna, zależnie od pochodzenia, stężenia oraz modelu doświadczalnego, może wykazywać różne funkcje biologiczne o odmiennym mechanizmie działania, zależnie od użytego modelu *in vitro*.

Struktura wisfatyny

Wykazano, że wisfatyna występuje w dwóch izoformach: wewnątrzkomórkowej (iNampt) i pozakomór-

kowej (eNampt). Wydzielana pozakomórkowo występuje w konformacji dimeru i jest uwalniana bez udziału aparatu Golgiego z komórek w drodze niepoznanego mechanizmu. Wisfatyna/Nampt składa się z dwóch domen, w obrębie których występują antyrównoległe struktury β -beczułki oraz α -helisy. Domena katalityczna, zawierająca reszty tyrozyny (Tyr¹⁸) oraz fenyloalaniny (Phe¹⁹³), wiąże substrat — nikotynamid (witamina PP, niacyna), katalizując reakcję syntezy NMN [4]. Wisfatyna/iNampt jako enzym wewnątrzkomórkowy analogicznie zwiększa stężenie NMN w cytozolu [5]. Na rycinie 1 przedstawiono reakcję enzymatyczną katalizowaną przez enzym — fosforybozylotransferazę nikotynamidu (wisfatyna/Nampt).

Wspólny gen kodujący wisfatynę/iNampt/eNampt jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 7 (7q22). Białko to jest wytwarzane przez aktywowane limfocyty [1], neutrofile [6], monocyty [7], makrofagi [8], hepatocyty [9], owodniowe komórki epitelialne [10], komórki śródbłonkowe naczyń [11], fibroblasty maziowe [12], komórki β trzustki [5] oraz adipocyty [13]. Revollo i wsp. [5] wykazali, że w mysie dojrzałe adipocyty brązowej i białej tkanki tłuszczowej (WAT, *white adipose tissue*), odpowiednio linia HIB-1B oraz 3T3-L1, wykazują ekspresję wisfatyny *in vitro*. W mediach hodowlanych tych komórek udowodniono także obecność wisfatyny. Wzrost ekspresji wisfatyny następował podczas różnicowania preadipocytów w dojrzałe adipocyty tkanki tłuszczowej. Ponadto autorzy wykazali zwiększony poziom ekspresji wisfatyny/iNampt w homogenatach tkankowych nerki, wątroby czy brązowej tkanki tłuszczowej myszy szczepu C57BL/6, natomiast w WAT, płucach, śledzionie, jądrach i mięśniach poziom ekspresji tego białka był niski. W tkance mózgowej oraz trzustce poziom ekspresji wisfatyny/iNampt był praktycznie niewykrywalny [5]. U człowieka największą liczbę kopii mRNA kodującego wisfatynę/iNampt wykazano w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej oraz w homogenatach tkankowych wątroby i płuc. Ekspresja genu kodującego wisfatynę jest obecna w niemal każdej tkance ludzkiej i jej poziom jest tkankowo wysoce specyficzny [2].



Rycina 1. Reakcja enzymatyczna katalizowana przez fosforybozylotransferazę nikotynamidu (Nampt)

Mechanizm oddziaływania wisfatyny na komórki docelowe

Fukuhara i wsp. [3] w 2005 roku wykazali, że wisfatyna wywołuje efekt insulino-mimetyczny w adipocytach linii 3T3-F442A, miocytach linii L6 oraz hepatocytach linii H4IIEC3 *in vitro*. Późniejsze dwie prace wskazują, że białko to wykazuje powyższy efekt także w komórkach mezangialnych nerek [14] oraz osteoblastach [15]. Jednak w żadnej z powyższych prac nie dostarczono dowodów na bezpośrednie oddziaływanie wisfatyny z receptorem insulinowym (IR, *insulin receptor*). W opozycji do wyników badań Fukuhary i wsp. znajdują się badania Revollo i wsp. [5], którzy wskazują, że wisfatyna oddziałuje na komórki docelowe bez udziału aktywacji IR, w drodze zależnej od syntezy NMN, przez funkcję katalityczną wisfatyny/Nampt. Ponadto Revollo i wsp. precyzyjnie odtworzyli warunki doświadczenia *in vitro* z pracy Fukuhary i wsp. z użyciem tych samych linii komórkowych i nie potwierdzili wyników badań tej grupy dotyczących funkcji insulino-mimetycznej wisfatyny *in vitro*.

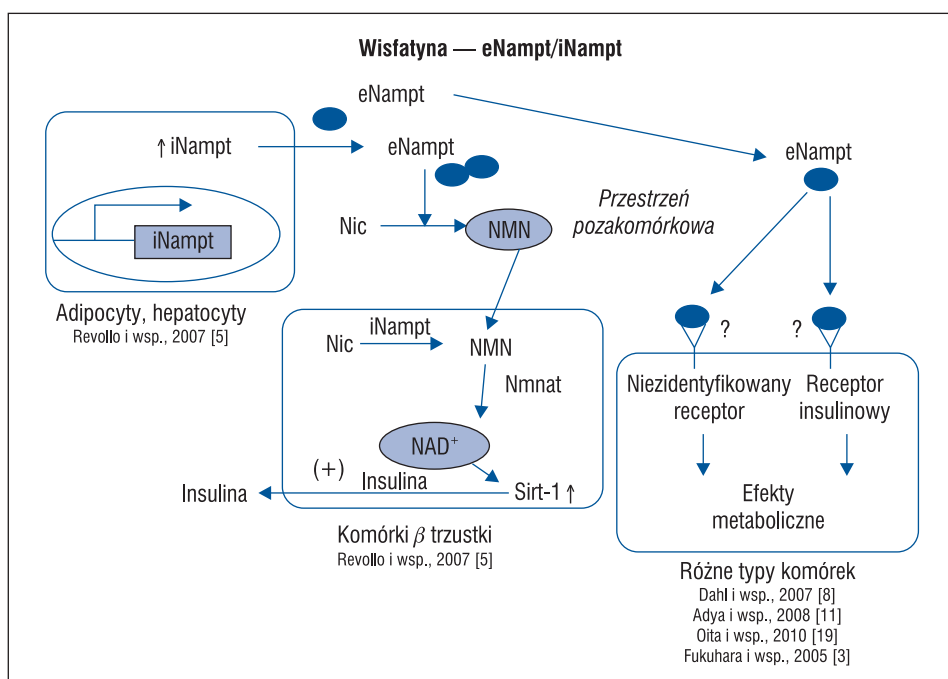
Obecnie uważa się, że wisfatyna wykazuje działanie biologiczne głównie przez aktywność enzymatyczną Nampt, dostarczając do komórek NMN, a nie w drodze klasycznej interakcji ligand-IR [5, 16, 17]. Interesujący wydaje się fakt, że insulina, transdukcując sy-

gnał wzrostowy przez IR w komórkach docelowych, podobnie jak wisfatyna może aktywować szlak kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*). Sugeruje się, że wisfatyna może aktywować tę samą drogę sygnałową bez udziału IR, w sposób pośredni przez NMN. Niewykluczone jest także oddziaływanie wisfatyny z własnym, niezidentyfikowanym do tej pory receptorem i aktywacja wewnątrzkomórkowego szlaku insulinowego [4].

W innym badaniu dowiedziono, że efekt oddziaływania wisfatyny/eNampt z komórkami docelowymi nie zależy od jej aktywności enzymatycznej. Li i wsp. [18] wykazali, że wisfatyna/eNampt warunkuje efekt antyapoptotyczny względem neutrofilii hodowanych *in vitro*, a efekt ten całkowicie nie zależy od jej funkcji katalitycznej. Autorzy wykazali powyższy efekt oddziaływania wisfatyny w hodowli komórkowej z medium wolnym od nikotynamidu (substratu dla enzymu Nampt). Ponadto dodanie inhibitora enzymu Nampt (APO866) w środowisku reakcji także nie skutkowało zwiększeniem odsetka komórek wchodzących w drogę programowanej śmierci (apoptozy) [18].

Na rycinie 2 przedstawiono różne proponowane mechanizmy oddziaływania wisfatyny na komórki docelowe.

Wykazano zwiększoną ekspresję genu kodującego wisfatynę/iNampt w adipocytach i hepatocytach



Rycina 2. Proponowane mechanizmy oddziaływania wisfatyny na komórki docelowe (źródła: [3, 5, 8, 11, 19]); i/eNampt — fosforybozylotransferaza nikotynamidu (izoforma wewnątrzkomórkowa i zewnątrzkomórkowa); NMN (*nicotinamide mononucleotide*) — mononucleotyd nikotynamidu; NAD⁺ — dinukleotyd nikotynamidoadeninowy; Nic (*nicotinamide*) — nikotynamid; Nmnat — adenylotransferaza mononucleotydu nikotynamidowego

ludzkich [5]. Wisfatyna/iNamp1 może być wydzielana na zewnątrz komórek w drodze niepoznanego mechanizmu niezależnie od funkcjonowania aparatu Golgiego [9]. W przestrzeni pozakomórkowej wisfatyna/eNamp1 może podlegać dimeryzacji i oddziaływać endokrynnie w konformacji dimeru — jako egzoenzym — na odległe tkanki i narządy, w tym regulować wydzielanie insuliny po glukozie przez komórki β trzustki przez zewnątrzkomórkową syntezę NMN. Komórki β trzustki, pobierając produkt katalizy enzymu Namp1 (NMN), dostarczają substrat dla enzymu Nmnat — adenylotransferazy mononukleotydu nikotynamidowego, katalizującego drugi etap w syntezie NAD^+ w komórce. Utrzymanie wysokiego stężenia eNamp1 w przestrzeni pozakomórkowej jest krytyczne dla utrzymania odpowiedniego stężenia NAD^+ w komórkach β trzustki, gdyż w komórkach tej tkanki poziom ekspresji iNamp1 jest stosunkowo niski. Zwiększenie wewnątrzkomórkowej puli NAD^+ w komórce warunkuje zwiększenie ekspresji genu kodującego deacetylazę Sirt-1, której aktywność wpływa na wydzielanie insuliny po glukozie [5]. Wisfatyna/eNamp1 może także oddziaływać na komórki docelowe w konformacji monomerycznej przez oddziaływanie z receptorem insulinowym [3, 8, 14, 15] lub z niezidentyfikowanym do tej pory receptorem [6, 7].

Wisfatyna wykazuje funkcje insulino-mimetyczne poprzez oddziaływanie z receptorem insulinowym?

Wisfatyna została opisana jako nowa adipocytokina o działaniu insulino-mimetycznym przez Fukuhara i wsp. w 2005 roku [3]. Jest ona adipocytokiną wytwarzaną głównie przez trzewną, a także podskórną tkankę tłuszczową u ludzi i myszy [3]. Wang i wsp. [16] wykazali zwiększoną ekspresję wisfatyny w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej, jak również stwierdzili zwiększone stężenie wisfatyny w mediach kondycjonowanych z hodowli okołonaczyniowej szczurzej tkanki tłuszczowej (PVATCM, *peri-vascular-adipose-tissue-conditioned media*). Berndt i wsp. [20] oraz Fukuhara i wsp. [3] wykazali, że stężenie krążącej wisfatyny dodatnio koreluje, odpowiednio, z zawartością VAT oraz wskaźnikiem masy ciała (BMI, *body mass index*) u ludzi. Wykazano, że stężenie wisfatyny może korelować z insulinoopornością, wykładnikami zaburzeń metabolicznych w cukrzycy typu 2 [4], otyłości [21–22], a także z krążącymi czynnikami prozapalnymi, będącymi markerami miażdżycy [23]. Fukuhara i wsp. dowiedli, że wisfatyna/eNamp1 jest insulino-mimetykiem i wykazuje efekt hipoglikemizujący *in vivo* oraz *in vitro*. W badaniu *in vitro* autorzy zaobserwowali, że wisfatyna, podobnie jak insulina, indukuje fosforylację wewnątrzkomórkowych substratów receptora insulinowe-

go (IRS-1, *insulin receptor substrate 1*) oraz IRS-2 w adipocytach linii 3T3-F442A, miocytach linii L6 i hepatocytach linii H4IIEC3 [24].

Właściwości insulino-mimetyczne wisfatyny potwierdzono także w osteoblastach [15] oraz w komórkach mezangialnych nerek *in vitro* [14].

Stymulacja wisfatyną/eNamp1 osteoblastów *in vitro* powodowała zwiększenie proliferacji oraz zwiększenie poboru glukozy w tych komórkach. Osteoblasty poddane działaniu inhibitora receptora insulinowego HNM-PA(AM)₃ oraz wisfatyny/eNamp1 (100 ng/ml) nie wykazywały powyższych efektów *in vitro* z powodu zahamowania transdukcji sygnału z IR. Wykazano, że blokowanie IR, w obecności wisfatyny oraz inhibitora IR, nie doprowadza do fosforylacji cząsteczek IRS-1 oraz IRS-2 w zakresie treoniny, blokując tym samym transdukcję sygnału, co potwierdzono w teście immunoprecipitacji lizatów komórkowych [15]. Song i wsp. [14] potwierdzili funkcję insulino-mimetyczną wisfatyny w komórkach mezangialnych nerek linii MC *in vitro*. Pod wpływem wisfatyny zaobserwowano zwiększoną ekspresję transportera glukozy GLUT-1 i jego translokację do błony komórkowej oraz 2-krotny wzrost zużycia glukozy w komórkach. Komórki linii MC, pod wpływem wisfatyny, w hodowli w stężeniu 10 ng/ml zwiększały o 80% ilość powstającego NMN w komórkach. Użycie inhibitora fosforybozylotransferazy nikotynamidu — FK866 (C₁₅H₂₀N₂O) — w skojarzeniu z wisfatyną zmniejsza pobieranie glukozy do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej. Zablokowanie ekspresji IR techniką wyciszania genów (siRNA) także skutecznie blokuje pobór glukozy przez komórki stymulowane wisfatyną. W tym modelu doświadczalnym wisfatyna wydaje się wykazywać funkcje biologiczne zarówno poprzez IR, jak i pośrednio przez NMN [14].

Wisfatyna oddziałuje na komórki docelowe, wykazując właściwości katalityczne enzymu Namp1

Badania Revollo i wsp. [5], Wang i wsp. [16] oraz Busso i wsp. [17] wskazują, że wisfatyna oddziałuje na komórki docelowe bez udziału aktywacji IR, w drodze zależnej od syntezy NMN przez funkcję katalityczną wisfatyny/Namp1.

Revollo i wsp. [5] nie potwierdzili funkcji insulino-mimetycznej wisfatyny *in vitro* oraz *in vivo*. Wykazano obecność wisfatyny w medium hodowlanym w pełni zróżnicowanych mysich adipocytów izolowanych od chorych z zespołem Simpson-Golabi-Behmel (SGBS, *Simpson-Golabi-Behmel syndrome*) oraz komórek linii 3T3-L1. Wisfatyna nie wywołuje zwiększonego zużycia glukozy przez te komórki. Wisfatyna nie aktywuje IR oraz nie doprowadza do fosforylacji białek IRS-1, IRS-2,

kinazy typu Akt w adipocytach linii SGBS oraz 3T3-L1. Autorzy ci, przeprowadzając badania na heterozygotycznych myszach transgenicznym z mutacją w obrębie genu kodującego *Nampt*^{+/}, dowiedli, że wisfatyna wpływa w sposób pośredni na wydzielanie insuliny. Po pierwsze, komórki β wysp trzustkowych izolowane z myszy transgenicznych wykazują obniżoną sekrecję insuliny po stymulacji glukozą oraz obniżenie o 1/3 wewnątrzkomórkowego stężenia NMN. Po drugie, obniżone stężenie osoczowe NMN oraz e/*Nampt* wykazano także *in vivo* u myszy *Nampt*^{+/-}. Efekt ten był całkowicie odwracalny w przypadku wykorzystania stymulacji komórek β wysp trzustkowych *in vitro* za pomocą NMN (produktu katalizy enzymatycznej enzymu *Nampt*) zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Autorzy sugerują, że wisfatyna/e*Nampt*, dostarczając substratu NMN, reguluje wydzielanie insuliny w sposób pośredni w komórkach β wysp trzustkowych przez zwiększenie ekspresji genu kodującego białko Sirt-1 (ryc. 2) [5].

Wisfatyna/e*Nampt* stymuluje także proliferację komórek mięśni gładkich (VSMC, *vascular smooth muscle cells*) *in vitro*. Efekt ten nie jest związany z aktywacją IR. Wang i wsp. [16] poddawali komórki VSMC działaniu różnych dawek (0,01 nM–10 nM) wisfatyny przez 24 godziny i zaobserwowali zwiększoną, maksymalnie 2-krotnie, intensywność proliferacji komórek w warunkach *in vitro*. Efekt ten był spowodowany zwiększoną syntezą NMN w medium hodowlanym na skutek aktywności enzymatycznej wisfatyny/e*Nampt*. Mononukleotydy nikotynamidowy pobierany przez komórki VSMC aktywował szlak MAPK *via* Erk1/2 oraz białko p38.

Wisfatyna a nowotwory

Wisfatyna prawdopodobnie bierze także udział w procesie kancerogenezy i progresji raka gruczołu krokowego [25] oraz nowotworów przewodu pokarmowego [26]. Wykazano jej zwiększoną ekspresję w komórkach glejaka [27], raka gruczołu krokowego [25], nowotworach jelita grubego [28], a zwłaszcza w komórkach nowotworowych niewrażliwych na chemioterapię. Nadmierna ekspresja wisfatyny w tkance nowotworowej glejaka złośliwego jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [27]. Wyniki nielicznych dotychczas badań wskazują, że może mieć ona związek z chorobami nowotworowymi. Kitani i wsp. [2] dowiedli, że wisfatyna jest zlokalizowana w cytoplazmie intensywnie proliferujących szczyrczych komórek izolowanych z guzów chromochłonnych linii PC-12, natomiast w komórkach PC-12, podlegających różnicowaniu pod wpływem czynnika wzrostu nerwów (NGF, *nerve growth factor*), jest ona zlokalizowana głównie w jądrze komórkowym. Zaskakujący wydaje się fakt, że w mediach

hodowlanych komórek linii PC-12 — Swiss 3T3 — nie wykazano obecności wisfatyny. Autorzy stwierdzają, że wisfatyna nie jest wydzielana przez komórki linii PC-12 oraz Swiss 3T3 do medium hodowlanego i przypuszczają, że funkcjonuje jako wewnątrzkomórkowe białko kontrolujące cykl komórkowy i proces różnicowania komórek [2]. Patel i wsp. [25] udowodnili, że wisfatyna zwiększa proliferację oraz inwazyjność komórek raka prostaty linii LNCaP oraz PC3 *in vitro*. W stężeniu 400 ng/ml dodana do hodowli komórkowej zwiększa o połowę ekspresję metaloproteiny MMP-2 oraz 1,5-krotnie MMP-9, co sugeruje, że w sposób bezpośredni może zwiększać inwazyjność komórek raka prostaty *in vitro*. Wisfatyna w stężeniach 25 ng/ml oraz 400 ng/ml zwiększała intensywność proliferacji komórek androgenoniezależnego raka prostaty linii PC-3, odpowiednio o 30% i 200%, nie wpływała jednak na proliferację androgenozależnych komórek LNCaP. Wisfatyna w wysokim stężeniu bezpośrednio oddziałuje na proliferację i inwazyjność komórek androgenoniezależnego raka prostaty *in vitro* wskutek aktywacji szlaku MAPK/Erk1/2 i p38 [25].

Komórki nowotworowe wykazują naturalną lub indukowaną oporność na proces apoptozy [29]. Antyapoptotyczny efekt wisfatyny przez aktywację szlaku sygnałowego kinaz PI3K/Akt zaobserwowano *in vitro* w ludzkich monocytach izolowanych z krwi obwodowej [28] oraz w ludzkich komórkach śródbłonkowych żyły pępowinowej (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) [11]. Wisfatyna wykazuje także efekt antyapoptotyczny względem neutrofilii *in vitro*, spowodowany zmniejszeniem aktywności kaspazy 3 [6]. Szlak sygnałowy kinaz PI3K/Akt reguluje także ekspresję genów kodujących metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMPs, *matrix metalloproteinases*) oraz czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) kontrolujących proces angiogenezy. Adya i wsp. [11] wykazali, że po 5 minutach inkubacji HUVEC z wisfatyną ponad 2-krotnie zwiększa się aktywność kinaz PI3K/Akt w lisatach komórkowych. Zwiększenie aktywności kinaz wiązało się ze wzrostem ekspresji genów MMP-2, MMP-9 oraz VEGF. Wisfatyna w stężeniu 100 nM zwiększa o 65% intensywność proliferacji komórek śródbłonkowych *in vitro*. Wzrost ekspresji genów MMPs oraz VEGF, pod wpływem stymulacji wisfatyną, wiązał się także ze zwiększeniem migracji komórek HUVEC w matrygelu *in vitro* [11]. Wisfatyna stymuluje ponadto wytwarzanie białek MCP-1 oraz IL-6 w HUVEC *in vitro*. Zastosowanie inhibitorów kinaz wewnątrzkomórkowych SB203580, wortmaniny oraz PD98059, hamujących odpowiednio szlak sygnałowy p38/MAPK, PI3K, Erk1/2, znosi powyższy efekt [23].

Aktywacja szlaku sygnałowego PI3K/Akt wiąże się z nabywaniem zdolności komórek nowotworowych do przerzutowania, nabywania oporności na apoptozę oraz indukcji procesu chemooporności na chemioterapeutyki [30]. Mutacje w obrębie genu supresji nowotworowej kodującego białko PTEN, hamującego aktywację kinazy Akt, występują w 30% linii komórek nowotworowych czerniaka [31]. Mutację w obrębie genu kodującego białko N-Ras, składowej szlaku sygnałowego Ras/Raf/MEK/ERK, wykazano w 15% przypadków czerniaka złośliwego u ludzi, w tym w liniach komórkowych: UKRV-Mel-15d, UKRV-Mel-19a, Ma-Mel-28 oraz Ma-Mel-43 *in vitro* [32]. Końcowym efektem aktywacji tego szlaku sygnałowego jest aktywacja kinaz Erk1/2 promujących proliferację, zwiększających inwazyjność komórek czerniaka oraz indukujących oporność na apoptozę. W prawidłowych komórkach kinaza Erk nie jest konstytutywnie aktywna [33].

Wzrost ekspresji wisfatyny w komórkach nowotworowych w guzie pierwotnym może być spowodowany hipoksją. Promotor genu kodującego wisfatynę ma dwa regiony HRE (*hypoxia response elements*) zależne od czynnika transkrypcyjnego indukowanego hipoksją (HIF-1 α , *hypoxia inducible factor-1 α*). Zmniejszenie prężności tlenu w tkance tłuszczowej osób otyłych zwiększa aktywność promotora dla wisfatyny, nasilając ekspresję tego białka poprzez nadekspresję białka HIF-1 α w adipocytach [34]. Białko HIF-1 α reguluje ekspresję wielu genów, w tym: VEGF, leptyny, wisfatyny, erytropoetyny i syntazy tlenu azotu. Induktorem ekspresji HIF-1 α są także onkogeny Src oraz Ras, które są konstytutywnie transkrybowane w niektórych typach nowotworów [24].

Z nielicznych badań wynika, że zastosowanie niskocząsteczkowych inhibitorów wewnątrzkomórkowego enzymu Nampt, takich jak APO866 [35], FK866 [36] oraz CHS-828 [37], jest skuteczną formą terapii przeciwnowotworowej. Nahimana i wsp. [35] wykazali skuteczność w eliminowaniu komórek wielu typów białaczek z zastosowaniem inhibitora enzymu Nampt (APO866). Autorzy wykazali efekt cytotoksyczny APO866 względem komórek ostrej białaczki limfoblastycznej linii B-ALL oraz przewlekłej białaczki mieloblastycznej linii CML. Autorzy ci nie stwierdzili cytotoksyczności względem prawidłowych komórek progenitorowych krwi. Efekt cytotoksyczny był spowodowany zmniejszeniem stężenia wewnątrzkomórkowego NAD⁺ oraz adenozyntrifosforanu deoksyrybonukleozydu, indukując proces śmierci komórek białaczkowych. Badacze stwierdzają, że indukcja śmierci komórek białaczkowych wynikała z obniżenia stężenia wewnątrz-

komórkowego NAD⁺ oraz powstałych uszkodzeń mitochondrialnych w mechanizmie autofagii niezależnym od aktywacji kaspaz.

Wisfatyna indukuje stres oksydacyjny w komórkach

Udowodniono także, że wisfatyna indukuje stres oksydacyjny przez tworzenie wolnych rodników tlenowych w mysich miocytach [19] oraz komórkach śródbłonna naczyń [11]. Stymuluje ona, zależnie od aktywacji szlaku sygnałowego, jądrowy czynnik transkrypcyjny $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$, *nuclear factor $\kappa\beta$*) i tworzenie wolnych rodników tlenowych w mysich miocytach linii C2C12. Stężenie 100 ng/ml wisfatyny po 18 godzinach stymulacji 2-krotnie zwiększało stężenie anionorodnika ponadtlenkowego. Dodanie do hodowli prekursora glutationu NAC (N-acetylocysteina) w stężeniu 1 mM skutkowało zmniejszeniem o 40% stężenia wolnych rodników tlenowych w komórkach. Użycie inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa\beta$, białka IKK (*I κ B kinase*) w kombinacji z wisfatyną w hodowli zmniejszyło o 25% produkcję wolnych rodników tlenowych w mysich miocytach linii C2C12 *in vitro* [19].

Wisfatyna jako cytokina o funkcji immunomodulacyjnej

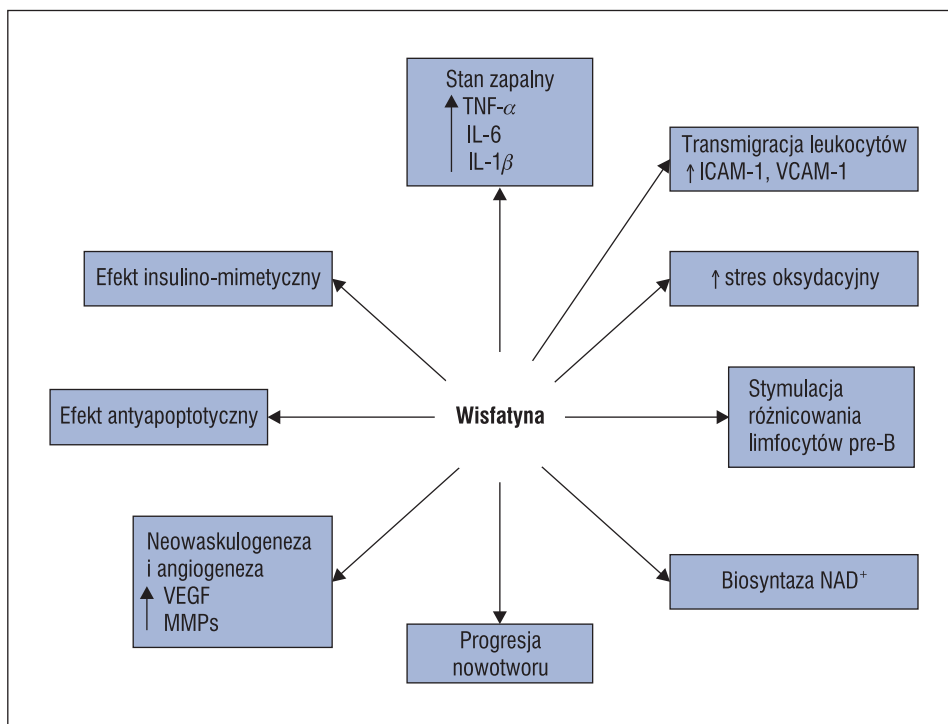
Wykazano zwiększone stężenie wisfatyny/eNampt także w surowicy krwi pacjentów z chorobami o podłożu zapalnym, takich jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego [8], czy u pacjentów zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C [38]. Zwiększoną ekspresję wisfatyny/iNampt zaobserwowano także w polipach jelita grubego izolowanych od pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna [7] oraz neutrofilach izolowanych od pacjentów z posocznicą [6]. Moschen i wsp. [7] dowiedli, że wisfatyna stymuluje ludzkie monocyty (CD14⁺) do wydzielania cytokin prozapalnych IL-1 β , IL-6 oraz czynnika martwicy guza α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*) *in vitro*. Zwiększa także ekspresję cząsteczek kostymulujących CD54 (ICAM-1), CD40, CD80 (B7-1). W badaniu tym autorzy stwierdzili ponadto, że wisfatyna stymuluje również sekrecję IL-6 w makrofagach oraz w komórkach dendrytycznych. Zastosowanie inhibitora kinazy proteinowej p38/MAPK w hodowli monocytów w obecności 100 ng/ml wisfatyny hamuje całkowicie sekrecję cytokin IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz IL-10. Stosowanie innego inhibitora kinazy typu MEK1 (MAP2K) powoduje, że monocyty stymulowane wisfatyną nie wydzielają cytokin prozapalnych IL-1 β , IL-6 oraz TNF- α , ale nie wpływa na sekrecję cytokiny przeciwzapalnej IL-10. Zablokowanie kinazy fosfatidyloinozytolu (PI3K, *phosphatidylinositol 3 kinase*) obniża sekrecję TNF- α oraz IL-10 w monocytach stymulowanych wisfatyną [7]. Ponieważ aktywacja kinazy typu

PI3K doprowadza do fosforylacji kinazy typu Akt, która zapewnia przetrwanie komórek układu immunologicznego, postuluje się, że wisfatyna, aktywując szlak sygnałowy PI3K/Akt, wykazuje działanie antyapoptotyczne względem tych komórek. Aktywacja kinazy typu B (PKB) w komórkach, zwanej także kinazą Akt, hamuje aktywność czynnika transkrypcyjnego (FOXO), zaangażowanego w aktywację procesu apoptozy w komórkach. Podobnie niektóre leki cytostatyczne, stosowane w chemioterapii systemowej, także mogą aktywować szlak sygnałowy PI3K/Akt, indukując chemooporność poprzez zwiększenie ekspresji białek antyapoptotycznych bcl-2 [39]. Wzrost ekspresji wisfatyny zaobserwowano także w neutrofilach, w odpowiedzi na sygnał zapalny — lipopolisacharyd (LPS), IL-1 β oraz IL-6. Wisfatyna w neutrofilach hamuje proces apoptozy w drodze zależnej od kaspazy 3. Jia i wsp. [6] potwierdzili także zwiększoną ekspresję wisfatyny w neutrofilach hodowanych *in vitro* pochodzących od pacjentów znajdujących się w krytycznym stanie posocznicy. Użyte w doświadczeniu oligonukleotydy antysensowne względem transkryptu kodującego wisfatynę lub przeciwciała blokujące aktywność wisfatyny zwiększają odsetek neutrofilii wchodzących w drogę programowanej śmierci komórek — apoptozy [6]. W innej pracy

Busso i wsp. [17] wykazali, że egzogenne dostarczenie inhibitora wisfatyny/Nampt skutecznie zmniejsza sekrecję cytokin prozapalnych w monocytach. Ludzkie monocyty hodowane *in vitro* w obecności inhibitora Nampt — APO866 oraz LPS wykazują mniejszą sekrecję cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1 β oraz IL-6) w odpowiedzi na sygnał zapalny w przeciwieństwie do monocytów traktowanych wyłącznie LPS. Zastosowanie inhibitora Nampt (APO866) zmniejsza pulę wewnątrzkomórkowego NAD⁺, nie wpływa jednak na żywotność monocytów w hodowli *in vitro* [17].

Podsumowanie

Najbardziej kontrowersyjna obecnie funkcja wisfatyny dotyczy jej właściwości jako hormonu o działaniu insulinomimetycznym. W zupełnej sprzeczności pozostają dwie doświadczalne prace z użyciem mysich adipocytów w modelu *in vitro*. Fukuhara i wsp. wykazali efekt insulinomimetyczny wisfatyny względem tych komórek i wskazali, że białko to oddziałuje na komórki docelowe przez receptor insulinowy [3]. Wyniki badań Revollo i wsp. [5] zaprzeczają powyższemu doniesieniu (brak zwiększenia poboru glukozy przez adipo-



Rycina 3. Sugerowane funkcje wisfatyny *in vitro*; MMPs (matrix metalloproteinases) — metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej; VEGF (vascular endothelial growth factor) — czynnik wzrostu śródbłonki naczyń; ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) — międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna typu 1; VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) — cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonki typu 1; TNF- α (tumor necrosis factor α) — czynnik martwicy guza α ; IL-7 (interleukin 7) — interleukina 7; IL- β (interleukin β) — interleukina β

cyty linii 3T3-L1 oraz SGBS *in vitro* pod wpływem wisfatyny/eNamp1), a wskazują na to, że wisfatyna/eNamp1 wpływa na metabolizm komórek β trzustki w mechanizmie zależnym od jej funkcji katalitycznej, a nie poprzez jej oddziaływanie z receptorem insulinowym [5]. W pracy Song i wsp. [14] wskazano na efekt insulinomimetyczny wisfatyny względem komórek mezangialnych nerek *in vitro* w mechanizmie zależnym od jej funkcji katalitycznej, a także oddziaływania z receptorem insulinowym. W innych pracach potwierdzono wpływ wisfatyny/eNamp1 jako czynnika prozapalnego o funkcji immunomodulacyjnej. Po pierwsze, wisfatyna pośrednio przez zwiększenie wydzielania IL-6 oraz aktywację czynnika STAT-3, w mechanizmie niezależnym od jej funkcji katalitycznej, autokrynnie powoduje spadek liczby komórek apoptotycznych — neutrofilów w hodowli *in vitro* [18]. Po drugie, wisfatyna/eNamp1 może także bezpośrednio oddziaływać na makrofagi, komórki den-

drytyczne w warunkach *in vitro*, stymulując komórki do sekrecji cytokin prozapalnych IL-6, IL-1 β (mechanizm oddziaływania nieznan) na skutek aktywacji wewnątrzkomórkowych czynników transkrypcyjnych [7]. Busso i wsp. [17] także potwierdzają funkcję wisfatyny jako enzymu wewnątrzkomórkowego (iNamp1) stymulującego sekrecję cytokin prozapalnych przez komórki immunokompetentne. Ponadto niewiele jest prac, w których autorzy także wykazaliby wpływ wisfatyny na proces proliferacji, angiogenezy i inwazyjności komórek nowotworowych *in vitro* [2, 11, 25] oraz wpływ tego białka jako czynnika generującego stres oksydacyjny w hodowli *in vitro* [11, 19]. Wydaje się, że wisfatyna — zależnie od pochodzenia, stężenia oraz modelu doświadczalnego — może wykazywać różne funkcje biologiczne o odmiennym mechanizmie działania, zależnie od użytego modelu *in vitro*. Na rysunku 3 przedstawiono funkcje wisfatyny *in vitro*.

Piśmiennictwo

- Samal B., Sun Y., Stearns G. i wsp.: Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14 (2): 1431–1437.
- Kitani T., Okuno S., Fujisawa H.: Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor. *FEBS Lett.* 2003; 544 (1–3): 74–78.
- Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M. i wsp.: Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 21: 307 (5708): 426–430.
- Sommer G., Garten A., Petzold S. i wsp.: Visfatin/PBEF/Namp1: structure, regulation and potential function of a novel adipokine. *Clin. Sci. (Lond.)* 2008; 115 (1): 13–23.
- Revollo J.R., Körner A., Mills K.F. i wsp.: Namp1/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell. Metab.* 2007; 6 (5): 363–375.
- Jia S.H., Li Y., Parodo J. i wsp.: Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J. Clin. Invest.* 2004; 113 (9): 1318–1327.
- Moschen A.R., Kaser A., Enrich B. i wsp.: Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J. Immunol.* 2007; 178 (3): 1748–1758.
- Dahl T.B., Yndestad A., Skjelland M. i wsp.: Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation* 2007; 115 (8): 972–980.
- Garten A., Petzold S., Barnikol-Oettler A. i wsp.: Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is constitutively released from human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 391 (1): 376–381.
- Ognjanovic S., Ku T.L., Bryant-Greenwood G.D.: Pre-B-cell colony-enhancing factor is a secreted cytokine-like protein from the human amniotic epithelium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005; 193 (1): 273–282.
- Adya R., Tan B.K., Punn A. i wsp.: Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 2008; 78 (2): 356–365.
- Nowell M.A., Richards P.J., Fielding C.A. i wsp.: Regulation of pre-B cell colony-enhancing factor by STAT-3-dependent interleukin-6 trans-signaling: implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54 (7): 2084–2095.
- Tanaka M., Nozaki M., Fukuhara A. i wsp.: Visfatin is released from 3T3-L1 adipocytes via a non-classical pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 359 (2): 194–201.
- Song H.K., Lee M.H., Kim B.K. i wsp.: Visfatin: a new player in mesangial cell physiology and diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2008; 295 (5): F1485–1494.
- Xie H., Tang S.Y., Luo X.H. i wsp.: Insulin-like effects of visfatin on human osteoblasts. *Calcif. Tissue Int.* 2007; 80 (3): 201–210.
- Wang P., Xu T.Y., Guan Y.F. i wsp.: Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide. *Cardiovasc. Res.* 2009; 81 (2): 370–380.
- Busso N., Karababa M., Nobile M. i wsp.: Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS One* 2008; 3 (5): e2267.
- Li Y., Zhang Y., Dorweiler B. i wsp.: Extracellular Namp1 promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (50): 34 833–34 843.
- Oita R.C., Ferdinando D., Wilson S. i wsp.: Visfatin induces oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes in an Akt- and MAPK-independent, NFkB-dependent manner. *Pflugers. Arch.* 2010; 459 (4): 619–630.
- Berndt J., Klötting N., Kralisch S. i wsp.: Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes* 2005; 54 (10): 2911–2916.
- Vazquez-Vela M.E., Torres N., Tovar A.R.: White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.* 2008; 39 (8): 715–728.
- Zwirska-Korczala K., Sadowski K., Konturek S.J. i wsp.: Postprandial response of ghrelin and PYY and indices of low-grade chronic inflammation in lean young women with polycystic ovary syndrome. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008; 59 (supl. 2): 161–178.
- Liu S.W., Qiao S.B., Yuan J.S. i wsp.: Association of plasma visfatin levels with inflammation, atherosclerosis and acute coronary syndromes (ACS) in humans. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2009; 71 (2): 202–207.

24. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J. i wsp.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2006; 160 (1): 1–40.
25. Patel S.T., Mistry T., Brown J.E. i wsp.: A novel role for the adipokine visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1 in prostate carcinogenesis. *Peptides* 2010; 31 (1): 51–57.
26. Nakajima T.E., Yamada Y., Hamano T. i wsp.: Adipocytokine levels in gastric cancer patients: resistin and visfatin as biomarkers of gastric cancer. *J. Gastroenterol.* 2009; 44 (7): 685–690.
27. Reddy P.S., Umesh S., Thota B. i wsp.: PBEF1/NAmPRTase/Visfatin: a potential malignant astrocytoma/glioblastoma serum marker with prognostic value. *Cancer Biol. Ther.* 2008; 7 (5): 663–668.
28. Van Beijnum J.R., Moerkerk P.T., Gersbers A.J. i wsp.: Target validation for genomics using peptide-specific phage antibodies: a study of five gene products overexpressed in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 2002; 101 (2): 118–127.
29. Coussens L.M., Werb Z.: Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420 (6917): 860–867.
30. Fecher L.A., Amaravadi R.K., Flaherty K.T.: The MAPK pathway in melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* 2008; 20 (2): 183–189.
31. Wu H., Goel V., Haluska F.G.: PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003; 22 (20): 3113–3122.
32. Bloethner S., Chen B., Hemminki K. i wsp.: Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. *Carcinogenesis* 2005; 26 (7): 1224–1232.
33. Smalley K.S.: A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int. J. Cancer* 2003; 104 (5): 527–532.
34. Segawa K., Fukuhara A., Hosogai N. i wsp.: Visfatin in adipocytes is upregulated by hypoxia through HIF1 alpha-dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 349 (3): 875–882.
35. Nahimana A., Attinger A., Aubry D. i wsp.: The NAD biosynthesis inhibitor APO866 has potent antitumor activity against hematologic malignancies. *Blood* 2009; 113 (14): 3276–3286.
36. Pogrebniak A., Schemainda I., Azzam K. i wsp.: Chemopotentiating effects of a novel NAD biosynthesis inhibitor, FK866, in combination with antineoplastic agents. *Eur. J. Med. Res.* 2006; 11 (8): 313–321.
37. Olesen U.H., Christensen M.K., Björkling F. i wsp.: Anticancer agent CHS-828 inhibits cellular synthesis of NAD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 367 (4): 799–804.
38. Kukla M., Zwirski-Korczala K., Gabriel A. i wsp.: Visfatin serum levels in chronic hepatitis C patients. *J. Viral. Hepat.* 2010; 17 (4): 254–260.
39. Chandras C., Koutmani Y., Kokkotou E. i wsp.: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B by corticotropin-releasing factor in human monocytes. *Endocrinology* 2009; 150 (10): 4606–4614.